

BEST AVAILABLE COPY

明 細 書

人工関節の作製方法

5 技術分野

本発明は、人工関節の作製方法に関する。具体的には、任意の曲面に適切な厚みを持つ細胞層をロードし、軟骨層を関節面全体に及んで修復するための基礎技術に関する。

10 背景技術

- 軟骨は、軟骨細胞と軟骨基質から構成される結合組織であり、関節骨は、十分に厚みのある軟骨により覆われている組織である。そして、関節は、スムーズな動きができるように軟骨によって支えられている。しかし、軟骨が一旦損傷や破壊を受けると、自然治癒することは極めて稀である。そのため従来、変形性関節症や、関節リウマチなどにより、関節としての機能が高度に低下した症例に対しては、金属やセラミックス、ポリエチレンからなる人工関節置換術が選択されてきた。この方法は、損傷した関節軟骨を切除し、金属やセラミックスやポリエチレンなどの人工物で関節面を覆うようにかぶせる手術法であり、世界中で広く普及し、現在でも主要な治療法である。また、長年にわたり素材の改良又はデザインの改良などで、10年以上の長期にわたって有用性が確認されている。

- しかし、金属やセラミックス、ポリエチレンは、生体にとって異物であり、また自己修復能力が望めない素材である。さらに素材に起因する様々な問題、例えば、摩擦、腐食疲労、人工関節と骨界面のゆるみ、沈み込み、感染などが生じる。実際に、人工関節が摩耗及び損傷し、再手術を余儀なくされている症例は数多くある。

従って、人工物を素材として利用する現在の人工関節を用いた治療法を代替する、あらたな治療法の開発が望まれていた。

近年、ES細胞や、自己由来の細胞をベースとした組織や器官の再生の研究が活発となっている。関節軟骨においても、部分欠損に関して様々な組織工学を利用

した技術が開発されてきた。例えば、欠損部に自己由来の細胞を移植することにより、周囲の健常部からの再生因子の分泌を誘導し、欠損の治癒を期待する方法が開発された (Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med. 1994 Oct 6;331(14):889-95)。しかし、この技術は欠損部を埋めるという方法に過ぎないため、広範囲の関節破壊に対する治療法として応用することは困難である。

一方、Vacantiらによって、欠損した耳介や指の再生方法に関する研究が発表された (Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. Plast Reconstr Surg. 1997 Aug;100(2):297-302)。この方法は、予め耳や指の形に成型したポリマーなどの担体の上に患者の細胞を付着させ、これをヌードマウスの皮下に移植して、マウスから供給される栄養を用いてコラーゲンなどの細胞外マトリックスの産生を促し、移植組織の形状を得るという方法である。ヌードマウスは免疫系が欠損したマウスであり、患者由来の細胞をマウス体内で増殖させた後、患者に再移植しても、拒絶反応がないという特徴を有するため利用価値が高い。

しかし、マウスの大きさには限界があり、そのため、この方法で作製可能な組織の大きさはマウスの大きさに依存する。また、この方法には宗教上の、あるいは動物愛護の観点から問題が生じる。さらに、動物に対する拒否感、狂牛病に代表される感染症のリスクなどを常に考慮しなければならない。マウスより大型の動物、例えばブタの免疫能を欠損させ、再生医療に応用する試みもあるが、この場合においても、他種動物の体内を経た組織をヒトに移植する行為に対する嫌悪感や未知の感染症のリスクなどの問題点に何らの解決を見出していない。

また、ゲルで鋳型を作り、鋳型の周囲に細胞懸濁液を付着した上で、ポリマーなどに細胞を付着させる方法が開示されている (特開2003-144139号公報)。この方法は、細胞懸濁液の付着を目的とするものであるため、実際には膜状のものが作製されるに過ぎず、関節軟骨のように厚みをもった組織を作製することは困難である。

このため、関節軟骨相当部分に厚みをもたせるため、あらかじめ分解性ポリマーで作製した、綿状の足場に軟骨細胞を付着させて厚みを持たせる方法が発表さ

れている。しかし、この方法によれば関節軟骨部分にポリマーが残存するため、分解される過程において有毒な物質に変わり、細胞に悪影響を与える可能性が危惧される (Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. Exp Cell Res. 1998 Apr 10;240(1):58-65.)。

- 5 他方、コラーゲンゲル内に細胞を埋没させて軟骨再生を行なう試みがなされているが、コラーゲンは牛など他の動物由来である点、移植母床との親和性に関して問題があると考えられる (Transplantation of cartilage-like tissue made by tissue engineering in the treatment of cartilage defects of the knee. J Bone Joint Surg Br. 2002 May;84(4):571-8.))。

10

発明の開示

上記のように、これまでの金属やセラミックス、ポリエチレンによる人工関節を代替し、広範囲の関節破壊に有効であり、さらに他種動物を用いることへの嫌悪感や未知の感染症のリスクを払拭できる、新たな人工関節の開発が望まれていた。

15

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行なった結果、任意の担体の表面に細胞塊を付着させて所定の条件で培養することにより、目的とする軟骨が形成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

すなわち、本発明は、目的の形状に加工した担体の表面に細胞塊を付着させ、軟骨組織への分化誘導条件下で前記細胞塊を培養することを特徴とする軟骨の作製方法である。さらに、本発明は、目的の関節の形状に加工した担体の表面に細胞塊を付着させ、軟骨組織への分化誘導条件下で前記細胞塊を培養することを特徴とする人工関節の作製方法である。

25

関節面としては、細胞、細胞が産生するマトリックス又はこれらの組合せにより形成されるものが挙げられる。

本発明の方法において、担体としてはトリリン酸カルシウム製のものを例示することができ、その表面が微細孔を有するものであることが好ましい。また、細胞としては間葉系幹細胞又は軟骨細胞が挙げられる。上記培養は、例えば生体外かつ成長因子又は増殖因子の存在下により行われる。

図面の簡単な説明

図1は、細胞だけからなる球状の関節面を示す図である。

図2は、ウサギ大腿骨遠位部の3次元データをもとに設計した担体の図である。

図3は、担体に細胞塊を付着させたことを示す図である。

図4は、担体に細胞塊を再度付着させたことを示す図である。

図5は、ウサギ大腿骨遠位関節面の全体像を示す図である。

10 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、細胞層が必要十分な厚みをもち、任意の曲面に付与することが可能である自己細胞由来の軟骨及び人工関節を作製する方法を提供するものであり、予め目的の形状に加工した担体の表面に細胞塊を付着させ、これを軟骨組織に分化し得る条件下で培養することを特徴とする。これにより、細胞塊は担体の形状にそって細胞塊同士が融合し関節面が再生され、人工関節として機能する。さらに、成長因子の添加や力学的負荷により、細胞外マトリックスの産生が増進され、強度の面においても理想的な関節軟骨を生体外で作製させることを特徴とするものである。

20 1. 細胞

培養の対象となる細胞は、幹細胞（ES細胞、臍帯血由来細胞、未分化間葉系幹細胞等）などの未分化細胞又はその分化型細胞である。特に、未分化間葉系幹細胞が好ましい。

骨芽細胞、軟骨細胞は未分化間葉系幹細胞から容易に分化誘導することが可能なため、これらの分化誘導した細胞（関節軟骨細胞、骨細胞等）も使用することができる。また、成体間葉系幹細胞を使用することもできる。

さらに、幹細胞は、複数の種類の細胞、例えば骨細胞と軟骨細胞とを組み合わせ任意の部位に混合して培養することができる。例えば、上層が軟骨細胞から作った細胞塊だけからなる層、下層が骨細胞由来の細胞塊のように2層に組み合

わせることができる。また、大腿骨の場合は、関節部分は軟骨系細胞塊を接着させ、骨の部分は骨系の細胞塊を接着させることができる。このような混合培養は、関節面を含む骨全体の再生に応用することが可能である。

上記細胞は、例えばマウス、ウサギ、ラット、モルモット、イヌ、ブタ、ヤギ、ウシなどの実験動物又は患者の骨髓から、Dexter法、磁気ビーズ法、セルソーティング法などの公知の手法により採取することができる。

ところで、細胞には、浮遊系細胞と足場依存性細胞とに大きく分類され、前者には血液系や免疫系の細胞が属し、後者には皮膚や骨などの細胞が属する。皮膚や骨などの細胞は、培養液中で浮いている状態では死んでしまうため、ガラスなどのシャーレに付着することで増殖する。このため、テフロン（登録商標）中に細胞を一カ所に集めるようにすると、細胞は足場を求めて、お互いに接着し合い、細胞凝集塊、すなわちスフェロイドが形成される。さらに、スフェロイド同士が接着・融合すると大きな形状のものができる。

Molecular Biology of the cell第三版に記載されているように、酵素処理などでばらばらにした細胞は、自然に凝集することが知られており、この現象はウニなどの下等動物から哺乳類の細胞でもみられることが知られている。この自然凝集は、カドヘリンを含むCell adhesion molecule (CAM) という細胞外接着因子によって引き起こされており、生物の発生初期における四肢の形成の際におこる間葉系幹細胞凝集とほぼ同様の現象が、成熟個体でも再現されていると考えられる (Gerisch, G. Curr. Top. Dev. Biol. 14: 243-270. 1980.; Hennings, H. Exp. Cell Res. 143: 127-142. 1983.; Moscona, A.A.; Hausman, R.E. Biological and biochemical studies on embryonic cell-cell recognition. In Cell and Tissue Interactions, Society of General Physiologists Series (J.W. Lash, M.M. Burger, eds.), Vol. 32, pp. 173-185. New York: Raven Press, 1977.; Roth, S.; Weston, J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 58: 974-980. 1967.)。

さらに近年、間葉系幹細胞から軟骨細胞への分化の際には、カドヘリンを介した細胞同士の接着がスイッチとなり、コラーゲンなどの発現が開始されることを示唆する報告がなされた (Yoon YM, J Cell Biochem 2002;87(3):342-59)。

そこで本発明においては、一旦スフェロイドにしてから所定の形状に形成する

ことが好ましい。本発明においては、上記間葉系幹細胞などを単層培養した後、撥水性又は細胞非接着性の丸底マルチウェル又はU字型ウェルに移してインキュベートする。その結果、細胞は自然に凝集して細胞塊（細胞凝集塊）を生ずる。細胞塊を生ずるまでのインキュベート時間は、6～48時間、好ましくは24～48時

5 間である。細胞塊の作成方法は、上記の方法のほか、巡回している溶液中に細胞懸濁液を入れる巡回培養法、試験管に細胞懸濁液を入れ、遠心分離器で沈殿させる方法、アルギネートビーズ法などが採用され、特に限定されるものではない。均一の細胞塊を大量に処理できる点で、撥水性や細胞非接着性のマルチウェルに細胞懸濁液を入れる方法が、効率がよい点で好ましい。

10 上記スフェロイドを形成することにより、細胞は細胞周期における静止期に移行し、タンパク質の産生が増加すると考えられる。なお、細胞を静止期に誘導してから分化させることを「細胞が増殖サイクルから外れて、細胞分化へ移行する」という。

15 2. 細胞塊の培養

次に、あらかじめ任意の形状に成形しておいた担体に上記の通り作製した細胞塊を付着させ、培養する。細胞塊の個数は特に限定されるものではなく、任意に設定することができる。さらに、必要であれば、付着後にさらに細胞塊を追加して付着させても、既存の細胞塊とも融合する。

20 本発明において、細胞塊を付着させる担体は、ヒトやウサギの関節構造に応じて任意に形状を設計することができる。さらに、耳介、鼻など、立体的な形状を得る目的の場合は、あらかじめ3次元データをもとにした鋳型を設計して担体を作製することが可能である。

「担体」とは、細胞塊が接着できる素材であって人工関節の全体又は一部を構成し、細胞塊の支持体として機能するものを意味する。この担体は、生体適合性の素材があり、生体内で吸収、自己組織に置換されるものが好ましい。また、担体の表面は微細孔を有していることが好ましい。このような担体として、例えばトリリン酸カルシウム製の担体が挙げられ、高分子の乳酸ポリマーなどの生体分解性のポリマーも適用可能である。

なお、担体のうち細胞塊を付着させる必要がない領域は、撥水性や細胞非接着性の素材でマスキングすることも可能である。

担体上に付着させた細胞塊同士は、生体が本来具備している創傷治癒とほぼ同等の機序に基づき、それぞれが融合し、結果的に目的の大きさ及び細胞構造を有する構造体を形成する。

本発明では立体構造を有する担体への細胞塊の付着を目的とするため、縦方向（高さ又は厚み）を長くする必要がある。その結果、細胞は液面から深いところに存在することとなり、ガス交換の効率が低下することになる。

そこで本発明では、培養液を、細胞塊の一部が気相に若干ふれる程度（気相にふれても乾燥しない程度）の量に調節することとした。そして、担体の微細孔から培養液が出入りして、細胞塊に届くようにした。「微細孔」とは、細胞塊は通過せず、培養液が通過できる程度の大きさの孔を意味する（直径10～500 μ m）。微細孔は、担体自体の成形過程で生じる場合もあるが、担体を細い針で突き刺して形成することも可能である。

培養液は自由に担体の微細孔を通過できるため、培養液を常に細胞に供給することができ、細胞塊は分化・成熟・細胞塊同士の融合、成熟を満足に行うことができる。なお、この場合の成熟とは、細胞が産生する各種コラーゲンやプロテオグリカンなどの細胞外マトリックスの増加を指しており、本来、生体内の細胞は豊富な細胞外マトリックスに囲まれていることが多い。

培養液の量は、細胞が増殖・分化することができる限り特に限定されるものではないが、1個の細胞塊あたり、全量で少なくとも0.5mlの培養液が必要である。

培養に用いられる培養液としては、10%FBS含有DMEM培地、血清無添加DMEMハイグルコース培養液などが挙げられる。

培養は、細胞塊が軟骨に分化し誘導し得る条件下で行なわれる。細胞塊から軟骨への分化誘導は、成長因子又は細胞増殖因子の存在下で培養すればよい。成長因子又は細胞増殖因子としては、骨形成タンパク質（BMP：Bone Morphogenetic Protein）、繊維芽細胞増殖因子（FGF：Fibroblast Growth Factor）、トランスフォーミング増殖因子（TGF- β ：Transforming Growth Factor- β ）、インスリン様増殖因子（IGF：Insulin-like Growth Factor）、血小板由来増殖因子（PDGF：Pl

atelet Derived Growth Factor)、血管内皮細胞増殖因子(VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor)などを用いることができる。

上記因子は、増殖させる大きさ、細胞外マトリックスの産生量に応じて、単独で、又は適宜組み合わせで種類や量を調整して添加する。例えば、間葉系幹細胞
5 から軟骨細胞に分化するにはTGF- β を添加するが、さらに、BMP、FGF、IGFなどを追加することにより、よりコラーゲンの豊富な軟骨様組織を得ることができる。

ここで、細胞に何らかの刺激が加わると、一般にmRNA量が増加し、その後タンパク質の産生が増加することが知られている。この点に着目し、本発明において
10 、培養条件(培養時間、その他の条件)を変え、細胞の成熟度を調整した。「成熟度」とは、細胞塊を骨や関節等の欠損部に移植するために適した度合いを意味する。その移植時期を、(1) mRNAが増加した時点で移植するか、(2) タンパク質(この場合、コラーゲンなどの細胞外マトリックス)が増加途中の時点で移植するか、あるいは(3) タンパク質が十分量産生された(=成熟)時点で移植するか
15 を検討することが可能である。

人工関節型の場合、タンパク質が十分産生された時期に移植を行うのが望ましく、培養期間は1ヶ月以上が好ましい。このため、長期にわたって、in vitroで変性しない担体を用いることが重要である。

一般に、RNA産生は誘導培養開始2週間でピークになり、その後コラーゲン産
20 生の上昇が見られ、5~6週で安定する。

さらに、各種成長因子又は増殖因子を添加することにより、細胞外マトリックスの量を調整することが可能である。また、静水圧やせん断弾力などの機械的刺激、超音波や衝撃波などを加えることにより、細胞外マトリックスを増やすことができる。従って、上記成長因子や静水圧や超音波などの機械的刺激を加えること
25 とで、RNA産生をピークにする時期を早めることができる。

成長因子又は細胞増殖因子としては、前記と同様、BMP、FGF、TGF- β 、IGF、PDGF、VEGFなどを用いることができる。

このように、培養条件や培養期間を調節することにより、成熟度を任意に調節することができる。

本発明の方法によれば、従来のヌードマウスの皮下に一時的に移植して再生組織を熟成させる方法とは異なり、動物を必要としない。そのため、マウスの体の大きさに制限されることなく、任意の大きさの形状が得られる。

患者本人の未分化間葉系幹細胞を用いることにより、骨、軟骨等の自己由来細胞を用いた組織を再生することが可能である。

以下、実施例により、本発明を具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕

10 本実施例は、ヒト股関節、大腿骨頭を模した実施例である。

ヒト骨髓由来間葉系幹細胞を単層培養した。最終的に間葉系幹細胞を15cmディッシュ一枚あたり 1.0×10^6 個得た。この細胞をトリプシン処理して細胞懸濁液にし、住友ベークライト社製スフェロイドプレートにそれぞれ 1.0×10^5 個の細胞が入るように播種した。その後37℃、5%二酸化炭素の条件下で培養を行い、翌日には直径が平均0.5mmの細胞塊が1プレートあたり96個得られた。この細胞塊を、半球状に加工したトリリン酸カルシウムの上に付着させた。その後、TGF- β を0.01 μ g/ml量添加し、48時間培養することにより、細胞塊を軟骨に分化させた。この曲面に付着した細胞塊同士は、24から48時間程度で融合し、細胞だけからなる球状の関節面が得られた（図1）。図1において、BはAの拡大図である。

20

〔実施例 2〕

本実施例は、ウサギ大腿骨遠位関節面の作製例である。

ウサギ関節軟骨切片にコラゲナーゼ処理を行い、得られた軟骨細胞の単層培養を行った。最終的に軟骨細胞を15cmディッシュ一枚あたり 1.0×10^6 個得た。この細胞をトリプシン処理して細胞懸濁液にし、住友ベークライト社製スフェロイドプレートにそれぞれ 1.0×10^5 個の細胞が入るように播種した。その後37℃、5%二酸化炭素の条件下で培養を行い、翌日には直径が平均0.5mmの細胞塊が1プレートあたり96個得られた。

一方、ウサギ大腿骨遠位関節面の形状を模して予め3次元データを作成し（図

2)、この形状のトリリン酸カルシウム製担体を作製した。

上記細胞塊をトリリン酸カルシウムの上に付着させた。このトリリン酸カルシウムの大腿骨遠位関節面には微細孔が付与されている。その後、TGF- β を0.01 μ g/ml量添加し、48時間培養することにより、細胞塊を軟骨に分化させた。この曲
5 面に付着した細胞塊同士は、24から48時間程度で融合し、細胞だけからなる関節面が得られた(図3)。図3において、やや褐色の部分が細胞塊を付着させた箇所である。さらに翌週(7日後)に、このようにして得られた関節面(図3)の上に320個の細胞塊を再度付着させた。その結果、新たに付着させた細胞塊は、既に付着している細胞塊と融合してスムーズな曲面を形成した(図4A)。

10 さらに上記関節面を320個の細胞塊を付着させた結果、最終的に図4Bに示すように目的の関節を作製することができた。図4Bにおいて、茶色の部分が細胞塊を付着させた領域である。周囲の白色部分が、余分な部分に細胞塊が付着しないようマスクとして用いたパラフィン樹脂である。

図5に、ウサギ大腿骨遠位関節面の全体像を示す。

15 図5Aはコンピュータに入力した3次元データをもとに作成した、トリリン酸カルシウムからなるウサギ大腿骨遠位関節面型の担体(細胞付着前)である。

図5B、図5Cは細胞塊付着翌日の概観である。軟骨相当部分にのみ細胞層が形成されているのがわかる。図5Dは細胞付着部(図5B、C)の拡大図である。若干細胞塊の境界が判明できる程度に融合している。

20

産業上の利用可能性

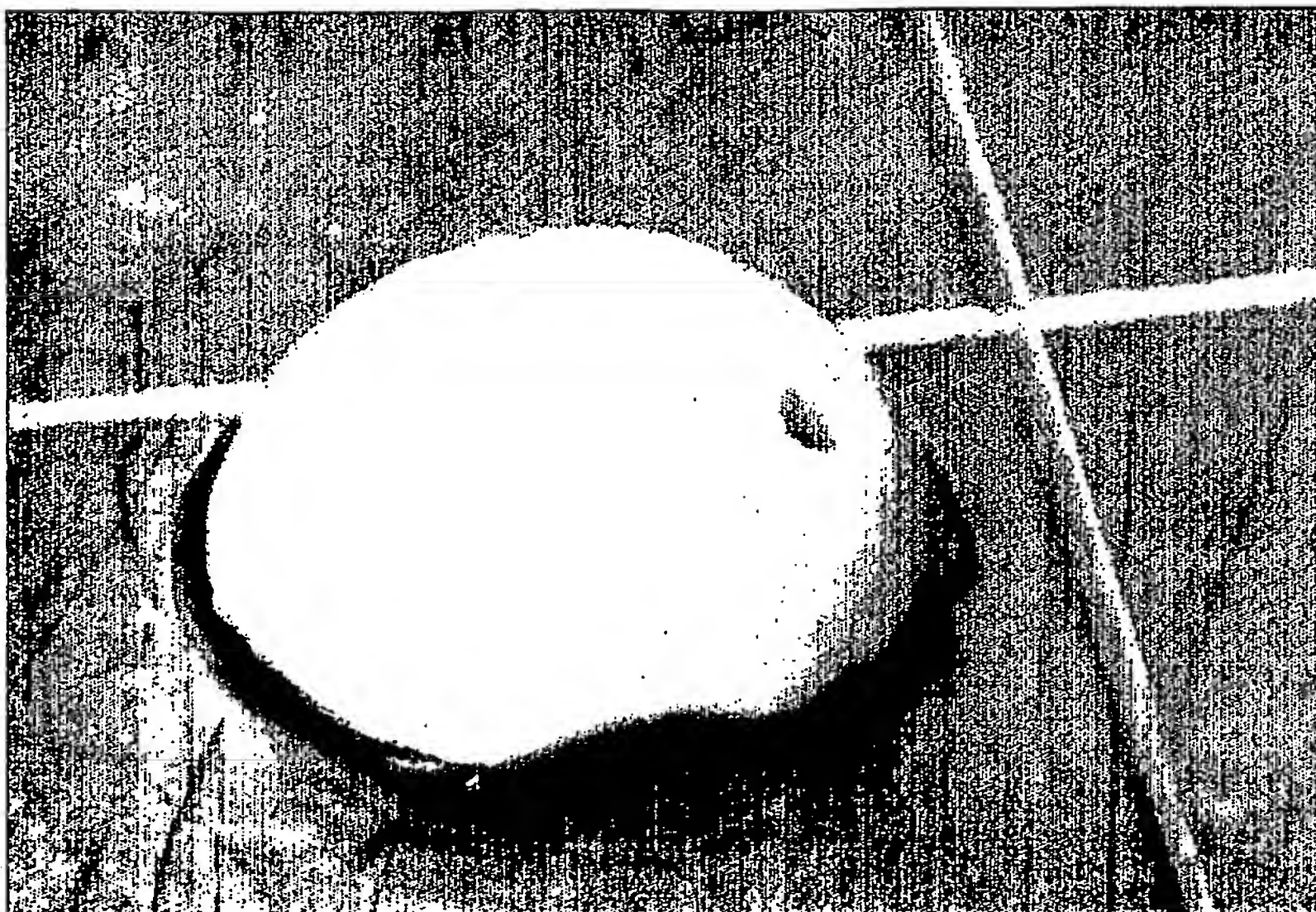
本発明により、軟骨及び人工関節の作製方法が提供される。本発明により提供される技術は、細胞凝集塊を多量に作成し、それぞれを融合する事で、ポリマーなどの担体を利用する必要がなく、自己由来の細胞単独で関節軟骨層を作製する
25 ことが可能である。更には、関節を成熟させるための動物への移植を必要としないため、他種動物を経由することなく、任意の形状の軟骨層を作製することが可能となる。

請 求 の 範 囲

1. 目的の形状に加工した担体の表面に細胞塊を付着させ、軟骨組織への分化誘導条件下で前記細胞塊を培養することを特徴とする軟骨の作製方法。
- 5 2. 目的の関節の形状に加工した担体の表面に細胞塊を付着させ、軟骨組織への分化誘導条件下で前記細胞塊を培養することを特徴とする人工関節の作製方法。
3. 関節面が、細胞、細胞が産生するマトリックス又はこれらの組合せにより形成されるものである請求項 1 又は 2 記載の方法。
- 10 4. 担体が微細孔を有するものである請求項 1 又は 2 記載の方法。
5. 細胞が間葉系幹細胞又は軟骨細胞である請求項 1 又は 2 記載の方法。
6. 培養が、生体外かつ成長因子又は増殖因子の存在下により行われるものである請求項 1 又は 2 記載の方法。

図1

A



B



図2

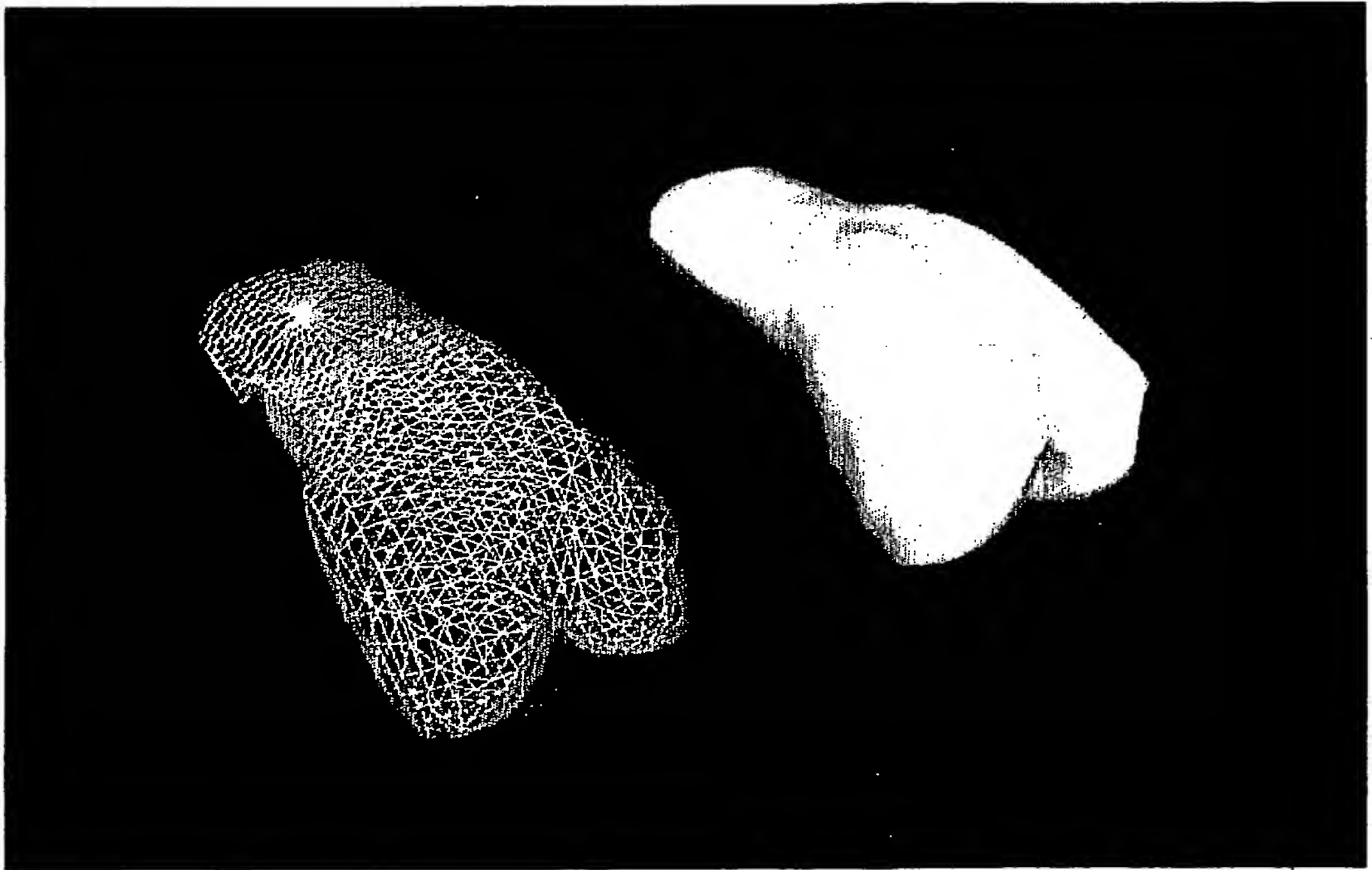


図3

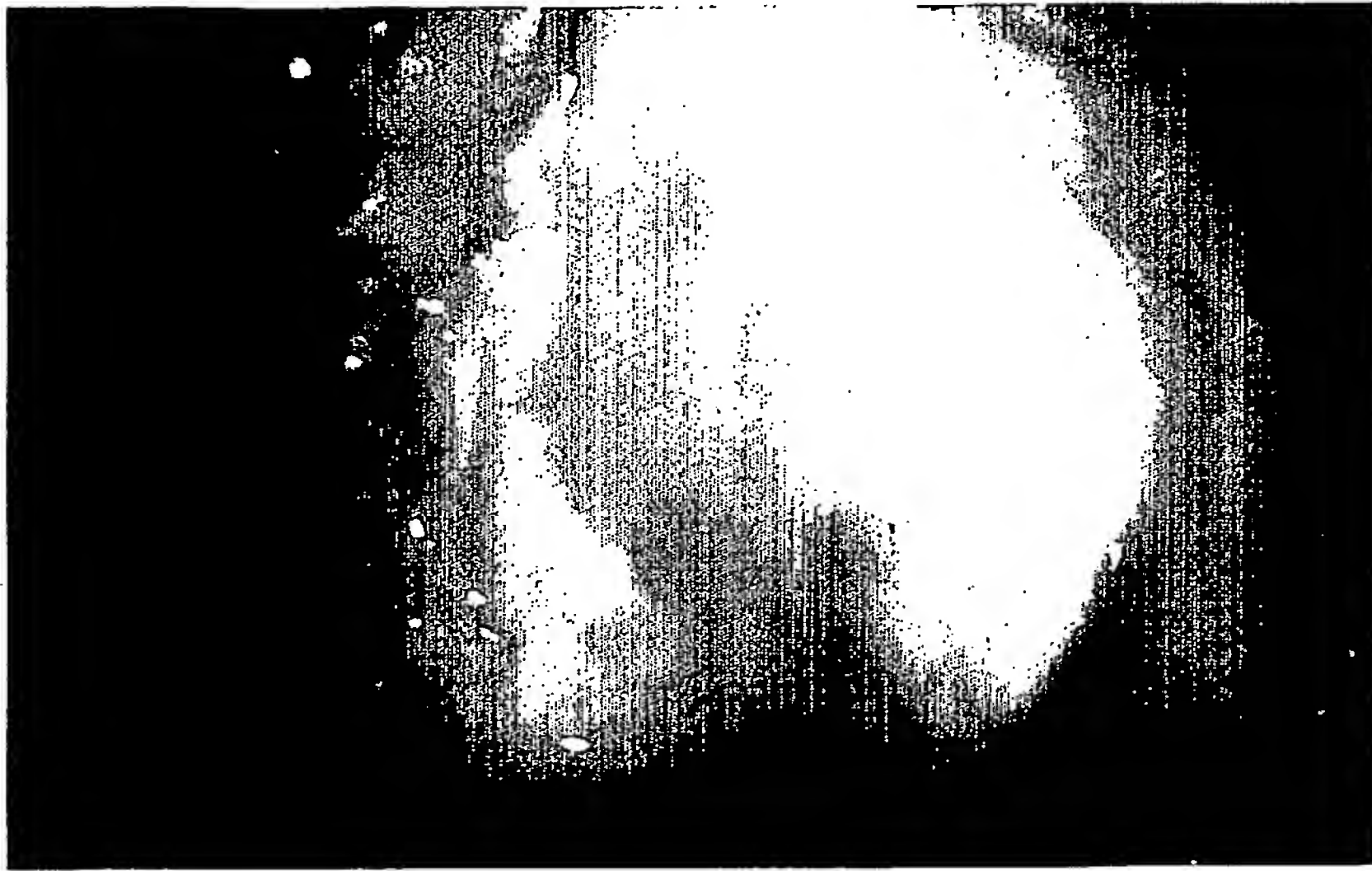
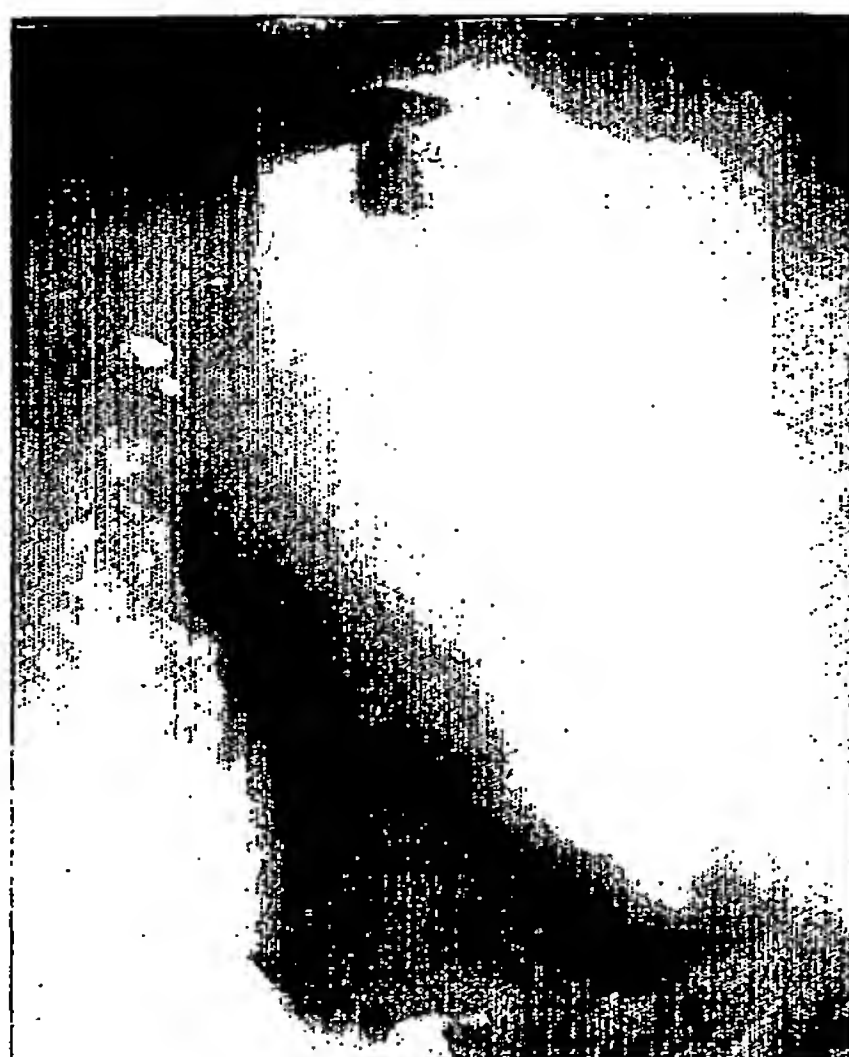


図4

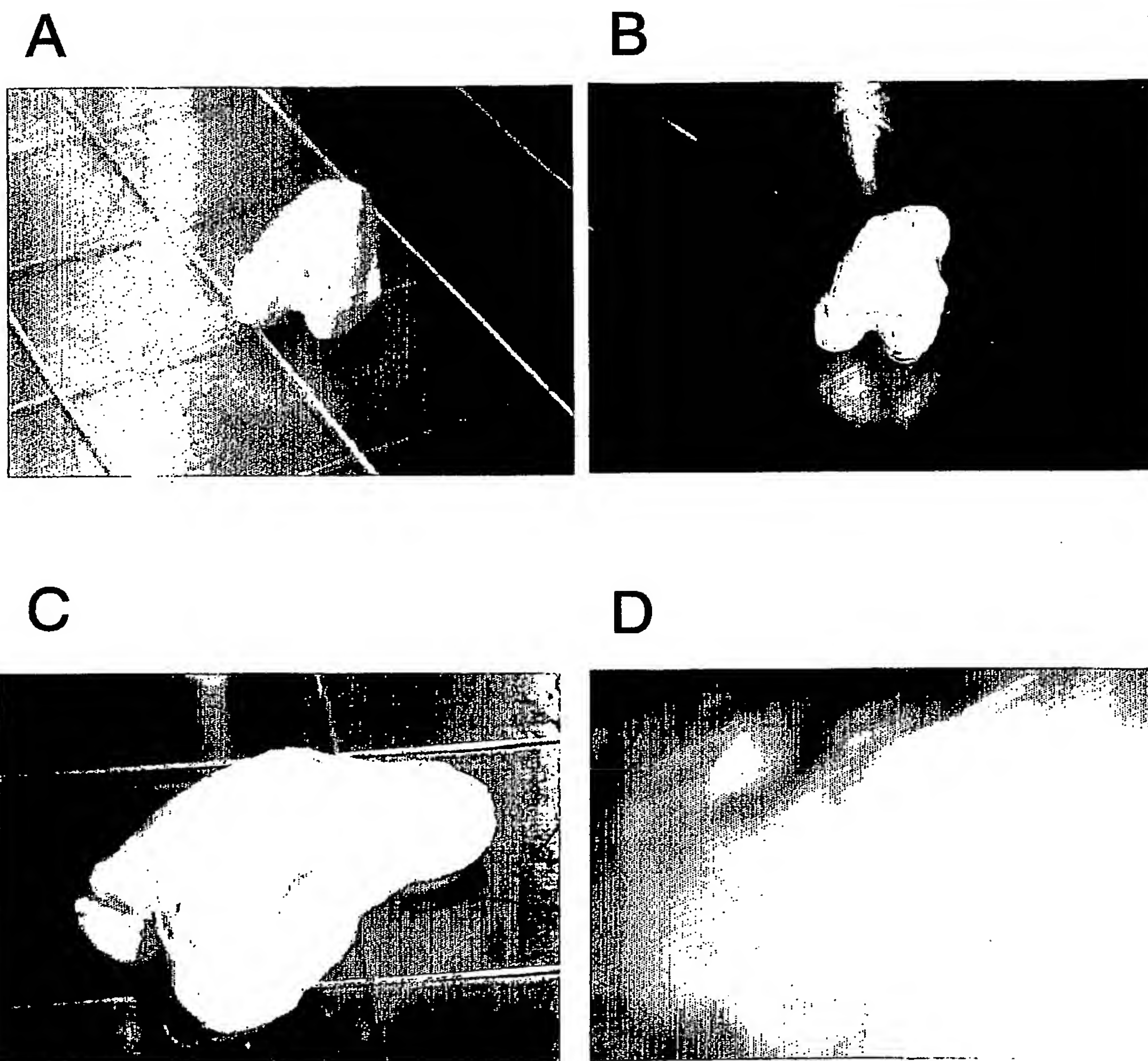
A



B



図5



A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L 27/00, C12N 5/06

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ A61L 27/00, C12N 5/06

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), MEDLINE (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	JP 2003-304866 A (独立行政法人産業技術総合研究所) 2003. 10. 28, 全文 &WO 03/87350 A &AU 2003/235200 A	1-6
Y	JP 2002-78484 A (メルク パテント ゲゼルシャフト ミット ベシュレンクテル ハフトング) 2002. 03. 19, 全文 &EP 1201749 A &CA 2356024 A &US 6730314 B	1-6

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 10. 2004

国際調査報告の発送日

09.11.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

八原 由美子

4C

9261

電話番号 03-3581-1101 内線 3451

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP 2002-537896 A (ラッシュープレズビテリアン ーセント ルークス メディカル センター) 2002. 11. 12, 全文 &WO 00/51527 A &US 6197061 B &EP 1158938 A &AU 771467 B	1-6
Y	JP 2003-111831 A (オリンパス光学工業株式会 社) 2003. 04. 15, 全文 (ファミリーなし)	1-6
Y	JP 2003-38635 A (オリンパス光学工業株式会社) 2003. 02. 12, 全文 (ファミリーなし)	1-6
A	Brian Johnstone et al., In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Progenitor Cells, Experimental Cell Research, Vol.238, p.265-272, 1998	1-6
A	Toshihiro Izumi et al., Chondrocyte transplantation for osteochondral defects with the use of suspensions culture, Cell and Tissue Banking, Vol.1, p.207-212, 2000	1-6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.